



⑯

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑯ N.º de publicación: **ES 2 077 533**
⑯ Número de solicitud: **9400395**
⑯ Int. Cl.º: **C08B 37/10**
A61K 31/725

⑯

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑯ Fecha de presentación: **28.02.94**

⑯ Solicitante/s: **Bioiberica, S.A.**
Polg. Ind. s/n Ctra. Nac. II Km. 680, 6
08389 Palafolls, Barcelona, ES

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.95**

⑯ Inventor/es: **Vila Pahi, F. Javier;**
Farrerons Gallemt, Carles;
Salvador Ravetllat, Luis y
Gomis Torne, Pedro

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.11.95

⑯ Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

⑯ Título: **Procedimiento de obtención de fracciones de oligosacáridos por despolimerización química de heparina.**

⑯ Resumen:

Procedimiento de despolimerización química de heparina, caracterizado porque se someten a una reacción de β -eliminación unos derivados de heparina en los que se ha sustituido parcialmente grupos carboxilato por grupos anhídrido. Dicha reacción se efectúa en un medio orgánico como la N-metil-2-pirrolidona por la acción de una base del tipo hidróxido de amonio cuaternario. Se obtienen de este modo unas fracciones de oligosacáridos que ofrecen ciertas mejoras de las propiedades farmacológicas con respecto a otras fracciones conocidas y que son útiles en el tratamiento de los trastornos tromboembólicos.

DESCRIPCION

Procedimiento de obtención de fracciones de oligosacáridos por despolimerización química de heparina.

5 El objeto de esta invención es un procedimiento de despolimerización química de heparina para obtener fracciones de oligosacáridos útiles en la prevención y tratamiento de las trombosis.

Estado de la técnica

10 La heparina está constituida por una mezcla de oligosacáridos cuyo peso molecular varía desde 4000 a 45000 Dalton y cuyo peso molecular medio está alrededor de los 12000 a 19000 Dalton. Sus propiedades anticoagulantes y antitrombóticas son bien conocidas y es ampliamente utilizada como tal en la clínica humana.

15 La heparina se administra por vía parenteral, subcutáneamente en la mayoría de los casos, y requiere una administración de tres veces al día o un tratamiento en continuo por vía intravenosa, dada su relativamente baja absorción por vía subcutánea. Esta baja biodisponibilidad puede ser ampliamente mejorada utilizando fragmentos de heparina obtenidos por fraccionamiento o despolimerización química o enzimática de la misma. Las propiedades finales de tales fragmentos dependen de su distribución de 20 pesos moleculares, composición química y método de obtención.

Entre los métodos conocidos de obtención de tales fragmentos por despolimerización química figura el que transforma parte de los grupos carboxilato de una sal de heparina en grupos éster mediante la acción de un agente alquilante del tipo cloruro de bencilo, para después realizar una reacción de β -eliminación mediante el empleo de una base preferentemente del tipo del hidróxido de sodio en un medio inorgánico (patentes ES 502.200 y ES 502.199, ambas del año 1981).

Explicación de la invención

30 De acuerdo con la presente invención se obtienen en primer lugar unos derivados de la heparina consistentes en que parte de los grupos carboxilato de una sal de heparina se han transformado en anhídridos mixtos por reacción con un cloruro de ácido o un cloroformiato de alquilo, para hacer reaccionar dichos derivados con una base, preferentemente orgánica del tipo de un Hidróxido de Amonio Cuaternario (NR_4^+ OH^-) para dar lugar a una reacción de β -eliminación.

35 El producto de reacción formado que contiene los grupos anhídrido mixto puede ser aislado y posteriormente despolimerizado, o más simplemente, despolimerizado sin necesidad de aislarlo, en el mismo medio de reacción.

40 Durante el proceso de formación de los mencionados anhídridos, pueden resultar esterificados algunos grupos hidroxilo, lo cual no interfiere el curso de la reacción siguiente de despolimerización y dichos grupos éster desaparecen por hidrólisis durante el transcurso del tratamiento posterior con una base.

45 La heparina de partida puede provenir de distintos orígenes animales (mucosa porcina, mucosa bovina, etc) aunque en el curso de los ensayos realizados para el desarrollo de esta invención se ha elegido la de origen porcino.

50 De acuerdo con la presente invención se dispone de la heparina en forma de sal sódica y hay que transformarla en una sal de amonio cuaternario para possibilitar su disolución en medios orgánicos. Las sales de amonio cuaternario más comúnmente utilizadas para este fin son: cloruro de benzalconio (cloruro de alquilbencildimetilamonio) o el cloruro de tetrabutilamonio.

55 Una vez obtenida dicha sal se disuelve en un medio orgánico adecuado como una N-alquil-2-pirrolidona, o la N,N-dimetil-formanida o el dimetilsulfóxido, preferentemente la N-metil-2-pirrolidona, que presenta la ventaja adicional de ser bio-degradable lo cual es interesante como protección medioambiental considerando los pequeños restos que pueden contaminar las aguas residuales. Además es reciclable mediante una simple destilación a vacío de la mezcla de disolventes final.

60 A esta solución a temperatura ambiente, se añade el cloruro de ácido o el cloroformiato de alquilo. Tanto en un caso como en otro, se utilizan los compuestos cuyo grupo alquilo es lineal, saturado y que contiene de 1 a 4 átomos de carbono.

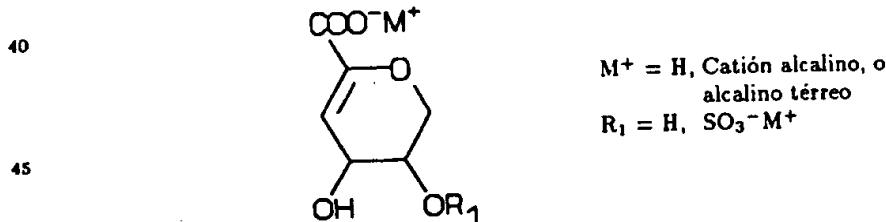
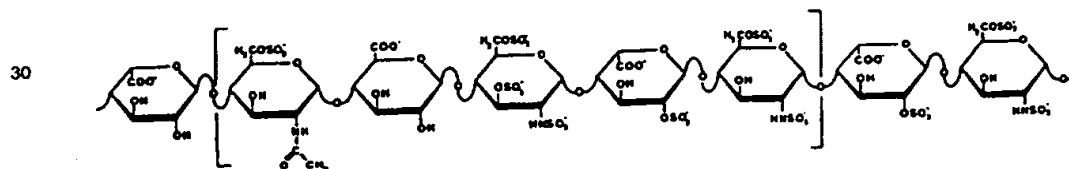
Después de un tiempo de reacción que varía de 2 a 5 horas a la temperatura ambiente se puede precipitar el derivado formado con un disolvente orgánico poco polar como el éter etílico, o proseguir la reacción mediante la adición en las mismas condiciones de una base orgánica del tipo de un hidróxido de amonio cuaternario como el hidróxido de N-benciltrimetilamonio (Tritón B) o el hidróxido de tetrabutilamonio y manteniendo las mismas condiciones durante un tiempo entre 2 y 3 horas. Finalmente, se precipita y purifica el producto obtenido mediante la adición de una mezcla de solución acuosa salina, acetona y metanol.

Las proporciones relativas de agente acilante (cloruro de ácido o cloroformiato de alquilo) y de agente 10 despolimerizante (base orgánica) con respecto al producto de partida (sal de amonio cuaternario de la heparina), determinan el grado de despolimerización de la heparina y por tanto el peso molecular medio del producto final. El tratamiento final con solución salina y metanol-acetona, determina la distribución de pesos moleculares de la mezcla final.

15 El proceso de la presente invención ofrece la ventaja de realizarse en un tiempo relativamente corto, realizarse a temperatura ambiente, dar elevados rendimientos de producto final, poder obtener fracciones de oligosacáridos con una distribución de pesos moleculares previamente determinada y que poseen unas propiedades bioquímicas y farmacológicas distintas a las demás fracciones hasta ahora conocidas con mejoras de algunos efectos farmacológicos valorados en experimentos con animales.

20 Las fracciones de oligosacáridos obtenidas con la presente invención se caracterizan por poseer la misma secuencia de unidades estructurales que la heparina de partida excepto en el lugar donde se ha producido la ruptura del enlace glicosídico en la reacción de β -eliminación, en que aparece un doble enlace.

25 Siendo la estructura de la heparina:



50 Los productos de la presente invención pueden estar en forma de sales metálicas con cationes alcalinos o alcalino-téreos o en forma de ácido libre, y más preferentemente en forma de sal sódica.

Son especialmente interesantes aquellas fracciones obtenidas por el procedimiento de esta invención cuyo peso molecular medio está alrededor de 2500 o 4000 Daltons que corresponden a lo que se denominan heparinas de Ultra Bajo Peso Molecular y heparinas de Bajo Peso Molecular, respectivamente.

55 Con el procedimiento de la presente invención se ha logrado obtener una fracción, que los inventores han denominado BF611, que tiene un perfil bioquímico indicativo de una mejora de las principales propiedades farmacológicas fundamentales, mayor actividad antitrombótica y menor potencial riesgo de hemorragia, en comparación con la heparina y con otras heparinas de Bajo Peso Molecular.

60 Dicha fracción según la invención, o sea la denominada BF611, tiene un peso molecular medio de 3800-4200 Daltons y una polidispersión muy baja ($Pd=1,24\pm0,01$) con un porcentaje de fracciones de

ES 2 077 533 A1

peso molecular mayor que 7500 D \leq 7,5%, y con un porcentaje de fracciones de peso molecular inferior a 1500 D \leq 1%.

Sus principales características bioquímicas expresadas como: actividad anti factor X activado (aXa), actividad anti factor II activado (aIIa) y Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (APTT), son (calculados sobre base anhidra):

10 aXa: 111 \pm 10% UI/mg
aIIa: 21 \pm 10% UI/mg
APTT: 23 \pm 10% UI/mg

y dan lugar a unas relaciones:

15 $\frac{aXa}{aIIa} \geq 5$ $\frac{aXa}{APTT} \geq 4$

que son el indicativo de una mayor actividad antitrombótica frente al efecto sobre la coagulación y consecuente riesgo hemorrágico. En efecto se ha determinado la eficacia antitrombótica de esta fracción frente a una heparina de Bajo Peso Molecular comercial (FRAXIPARIN[®]) en un modelo de trombosis arterial inducida en la arteria carótida del conejo (cf. XII International Congress on Thrombosis. Florence. 19-23 Mayo 1992. C. Bevilacqua y col) con los siguientes resultados (tabla 1):

Tabla 1

25 *Ensayo comparativo de eficacia antitrombótica*

	Dosis mg/kg	Nº Animales ocluidos/ Nº Animales tratados	Tiempo hasta occlusión antes después Tratamiento (min)	CT10
BF611				
35	1,5	3/6	9 39	10
	3,0	0/6	10 > 60	11,5
	6,0	0/7	10 > 60	16
CY216				
40	3	5/9	8 34	23
	6	2/9	7 51	>24

45 CY216:FRAXIPARIN[®]

CT10:

50 Concentración de Trombina necesaria para coagular el plasma en 10 seg ex vivo.

Asimismo se ha determinado el potencial efecto hemorrágico de la fracción BF611 comparado con el de la heparina midiendo el tiempo de sangría en la rata después de la transacción total de la cola (Template Bleeding Time), obteniéndose los siguientes resultados:

55

60

Tabla 2
Tiempo de sangría

	Dosis / (mg/kg)	t/segundos
	Control	127
10	heparina 1 BF611 1	248 189
15	heparina 2 BF611 2	575 224
20	heparina 3 BF611 3	544 222
	heparina 5 BF611 5	600 474

25 La mayor biodisponibilidad por vía subcutánea se ha estudiado en el conejo y en el voluntario sano, resultando ser en ambos casos superior al 90%, cuando la heparina no supera el 25%.

30 Los productos de la presente invención pueden ser administrados para el tratamiento y prevención de las alteraciones tromboembólicas, con un vehículo adecuado por vía intravenosa o subcutánea, dependiendo la dosis de la circunstancia clínica de que se trate, principalmente del nivel de riesgo de trombosis y si se pretende una profilaxis o una terapia de la misma.

Ejemplos:

35 Ejemplo 1

Se prepara una disolución de 20 g de heparinato de benzalconio en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añaden 750 μ l de cloruro de acetilo y se deja la mezcla 3 horas, con agitación, a temperatura ambiente. 40 Se añaden 12 ml de Tritón B y se continua la agitación durante 2 horas más. Se precipita el crudo de reacción mediante la adición de 500 ml de una mezcla 1:2 de acetona y metanol en primer lugar y a continuación, 250 ml de una disolución al 10% de NaCl en agua. Se filtra y se lava el precipitado dos veces, con 250 ml de metanol y con agitación. Se filtra y se seca en estufa de vacío a 60°C durante 12 horas. El sólido resultante se disuelve en 75 ml de agua y se añade 1,5 g de NaCl. A continuación 45 se precipita el producto mediante la adición de 150 ml de metanol. Se filtra y se lava el precipitado obtenido con dos porciones de 80 ml de metanol, con agitación. Se filtra con succión y se seca en estufa de vacío a 60°C durante 48 horas. Se obtienen 5,16 g de un sólido de color blanco (rendimiento 63%) cuyas características son:

50 *H.P.L.C.* (Columna TSK-PROGEL(SUPELCO), flujo de 0,5 ml/min de disolución de NaCl 0,1 N estabilizado con azida sódica.

55 M_w (peso molecular medio) = 4036
 P_d (Polidispersión) = 1,23
% > 7500 = 7,1
% < 1500 = 0,9

60 *Anti-Xa:* 117 sobre base anhidra. (Método amidolítico con plasma humano).
APTT: 24,5 sobre base anhidra.(Método coagulométrico con plasma humano)

*IR (KBr)*Entre 3800 y 3000 cm^{-1} / Tensiones O-H y N-HEntre 2990 y 2870 cm^{-1} / Tensiones C-H alifáticas.1640 cm^{-1} / Tensión CO de COO^-Na^+ 5 1430 cm^{-1} / Flexiones C-H alifáticas1230 cm^{-1} / Tensiones C-O*¹H-RMN (D₂O / 60° C) (500 MHZ)*10 δ = 5,98 ppm / d. (J = 0,5 Hz) / H-4 en unidad terminal.Entre δ = 5,59 ppm y δ = 5,39 ppm / señal compleja / H-1 de GlcN (Glucosamina).Entre δ = 5,22 ppm y δ = 5,16 ppm / señal compleja / H-1 de IdoA (Ácido Idurónico). δ = 2,20 ppm / s. / CH₃-CO-NH.

15 La relación de integrales entre las señales correspondientes a H-1 de IdoA y GlcN es aproximadamente de 1:1.

*¹³C-RMN (D₂O / 60° C) (105 MNZ)*20 δ = 174,9 ppm / C6 de unidades de urónico. δ = 169,5 ppm / C6 de unidad terminal. δ = 146,5 ppm / C5 de unidad terminal. δ = 106,3 ppm / C4 de unidad terminal. δ = 99,6 ppm / C-1 de IdoA25 Entre δ = 97,8 y δ = 97,3 ppm / C-1 de GlcNEntre δ = 70,1 y δ = 69,2 ppm / C-6 de GlcNEntre δ = 58,4 y δ = 58,1 ppm / C-2 de GlcN δ = 22,2 CH₃-CO-NH.30 *U.V. (D₂O) (Máximos): 195 nm / 230 nm**Rotación específica: +31,3°***Ejemplo 2**35 Se prepara una disolución de 20 g de heparinato de benzalconio en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añaden 950 μl de cloroformiato de etilo y se deja la mezcla 3 horas, con agitación, a temperatura ambiente. Se añaden 16 ml de Tritón B y se continua la agitación durante 2 horas más. Se procede como en el Ejemplo 1 y se obtienen 5,57 g de un sólido blanco (rendimiento del 68%) cuyas características son:40 *H.P.L.C. (Mismas condiciones que en el Ejemplo 1)* $M_w = 4012$ $P_d = 1,24$ $\% > 7500 = 7,0$ 45 $\% < 1500 = 1,0$ *Anti-Xa: 119 sobre base anhidra.**APTT: 24,3 sobre base anhidra.*50 Los métodos utilizados para la determinación de las actividades son idénticos a los descritos en el ejemplo 1. El resto de características espectroscópicas del producto obtenido (IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y UV) son iguales a las descritas en el ejemplo 1.**Ejemplo 3**55 Se prepara una disolución de 20 g de heparinato de benzalconio en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añade 950 μl de cloroformiato de etilo y se deja la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se precipita el crudo de reacción vertiéndolo lentamente y con agitación sobre 980 ml de éter etílico. Se decanta el sobrenadante y el residuo pastoso se agita con 300 ml de éter etílico. Se filtra y el residuo blanco resultante se lava, con agitación, con tres porciones de 300 ml de éter etílico. Se filtra y se seca en estufa de vacío a 40°C durante 48 horas. Se obtienen 19,8 g de un sólido blanco cuyas características espectroscópicas confirman que se trata de un anhídrido mixto en forma de sal de

ES 2 077 533 A1

benzalconio. El rendimiento es del 99%.

Las características del producto son las siguientes:

5 *IR (film evaporado de CHCl₃)*
Entre 3800 y 3000 cm⁻¹/ Tensiones O-H y N-H.
3070 cm⁻¹/ Tensiones C-H aromáticas.
Entre 2980 i 2870 cm⁻¹/ Tensiones C-H alifáticas.
10 1790 y 1760 cm⁻¹ (Banda ancha)/ Tensiones CO en anhídrido mixto.
1640 cm⁻¹ (Banda ancha)/ Tensión CO en COO-Bz⁺ y carbonato.
1500 cm⁻¹/ Tensión C=C aromática.
1250 cm⁻¹/ Tensiones C-O.
760 y 690 cm⁻¹/ Flexiones C-H fuera del plano en anillo aromático monosustituido.
15 *¹H-RMN (N,N-dimetiformida)(500 MHz)*.
Entre δ = 7,50 y δ = 7,00 ppm / señal compleja/ protones aromáticos.
Entre δ = 5,60 y δ = 5,18 ppm/ señal compleja/ H-1 de GlcN.
Entre δ = 5,21 y δ = 5,18 ppm/ señal compleja/ H-1 de IdoA
20 δ = 4,30 ppm/ q. / CH₂-O-
δ = 2,10 ppm/ s. / CH₃-CO-NH-
δ = 1,60 ppm/ t. / CH₃-CH₂-O-
25 *¹³C-RMN (N,N-dimetilformamida)(500 MHz)*
δ = 174 ppm/ C6 de unidades de urónico.
Entre δ = 125 y δ = 110 ppm / Carbonos de anillo aromático.
δ = 99,6-97 / C-1 de IdoA y GlcN
30 Entre δ = 70,5 y δ = 68,5 ppm/ C-6 de GlcN.
Entre δ = 59 y δ = 57 ppm/ C-2 de GlcN.
δ = 65 ppm / CH₂-O-
δ = 30 ppm/ CH₃-CH₂-
δ = 22 ppm/ CH₃-CO-
35 *UV (CH₃CN)* (Máximos): 260 nm/195 nm

Ejemplo 4

40 Se prepara una disolución de 20 g de heparinato de benzalconio en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añaden 750 µl de cloruro de acetilo y se deja la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se procede como en el Ejemplo 3 y se obtienen 19,4 g de un sólido blanco cuyas características espectroscópicas confirman que se trata de un anhídrido mixto en forma de sal de benzalconio. El rendimiento es del 98,5%.

45 Las características del citado producto son las siguientes:

50 *IR (film evaporado de CHCl₃)*
Entre 3800 y 3000 cm⁻¹/ Tensiones O-H y N-H.
3070 cm⁻¹/ Tensiones C-H aromáticas.
Entre 2980 i 2870 cm⁻¹/ Tensiones C-H alifáticas.
1790 y 1760 cm⁻¹(Banda ancha)/ Tensiones CO en anhídrido mixto y éster (esta última se encuentra englobada en la de 1760 cm⁻¹).
55 1640 cm⁻¹/ Tensión CO en COO-Bz⁺.
1500 cm⁻¹/ Tensión C=C aromática.
1250 cm⁻¹/ Tensiones C-O.
760 y 690 cm⁻¹/ Flexiones C-H fuera del plano en anillo aromático monosustituido.

ES 2 077 533 A1

¹H-RMN (*N,N*-dimetiformamida)(500 MHz).

Entre δ = 7,50 y δ = 7,00 ppm / señal compleja/ protones aromáticos.

Entre δ = 5,60 y δ = 5,20 ppm / señal compleja/ H-1 de GlcN y IdoA

5 δ = 2,10 ppm/ s. / CH³-CO-NH δ = 2,00 ppm/ señal ancha. / CH³-CO-O- de anhídrido mixto y éster.

¹³C-RMN (*N,N*-dimeotiformamida)(500 MHz).

6 δ = 175 ppm/ C6 de unidades de urónico.

10 Entre δ = 125 y δ = 110 ppm / Carbonos de anillo aromático.

Entre δ = 99,5 y 97 / C-1 de IdoA y GlcN

Entre δ = 70,5 y δ = 68,5 ppm/ C-6 de GlcN.

Entre δ = 59 y δ = 58 ppm/ C-2 de GlcN.

6 δ = 22,0 ppm / CH₃-CO-

15 δ = 20,1 ppm (ligeramente ancha) / CH₃-CO-O-

UV (CH₃CN) (Máximos): 260 nm / 195 nm

Ejemplo 5

20 Se prepara una disolución de 20 g del anhídrido mixto obtenido en el ejemplo 3 en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añaden 16 ml de Triton B y se deja la mezcla con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se procede como en el Ejemplo 1 y se obtienen 5,02 g de un sólido blanco (rendimiento del 25 61%) cuyas características son:

H.P.L.C.(Mismas condiciones que en el ejemplo 1)

Mw = 4054

Pd = 1,24

30 % > 7500 : 7,0

% > 1500 : 1,0

Anti-Xa: 115 sobre base anhidra.

35 APTT : 24,8 sobre base anhidra.

Los datos espectroscópicos (IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, UV) coinciden con los descritos en el ejemplo 1.

Ejemplo 6

40 Se prepara una disolución de 20 g del anhídrido mixto obtenido en el ejemplo 4 en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. Se añaden 12 ml de Triton B y se deja la mezcla con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se procede como en el Ejemplo 1 y se obtienen 4,66 g de un sólido blanco (rendimiento del 57%) cuyas características son:

H.P.L.C. (Mismas condiciones que en el ejemplo 1)

Mw = 4080

Pd = 1,24

50 % > 7500 : 7,2

% > 1500 : 0,8

Anti-Xa: 122 sobre base anhidra.

APTT: 24,7 sobre base anhidra

55 Los datos espectroscópicos (IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, UV) coinciden con los descritos en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

60 Siguiendo las mismas condiciones y procedimiento del Ejemplo 2 y sustituyendo el disolvente por *N,N*-dimetilformamida, se obtienen 5,30 g de un sólido blanco (rendimiento del 65%) cuyas características son:

H.P.L.C. (Mismas condiciones que en el ejemplo 1)

Mw = 4007

Pd = 1,23

5 % > 7500 = 7,1

% < 1500 = 0,9

El conjunto de datos espectroscópicos de la muestra (IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, UV) coincide en su totalidad con los presentados en el ejemplo 1.

10 Ejemplo 8

Siguiendo las mismas condiciones y procedimiento que en el Ejemplo 2 y sustituyendo el disolvente por dimetilsulfóxido, se obtienen 5,12 g de un sólido blanco (rendimiento del 63%) cuyas son :

15 *H.P.L.C.* (Mismas condiciones que en el ejemplo 1)

Mw = 4021

Pd = 1,23

20 % > 7500 = 7,2

% < 1500 = 0,9

El conjunto de datos espectroscópicos de la muestra (IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, UV) coincide en su totalidad con los presentados en el ejemplo 1.

25 Ejemplo 9

Se prepara una disolución de 20 g de heparinato de benzalconio en 200 ml de N-metil-2-pirrolidona. A continuación se añaden 1200 μl de cloruro de acetilo y se deja la mezcla 3 horas, con agitación, a 30 temperatura ambiente. Se añaden 12 ml de Tritón B y se continua la agitación durante 2 horas más. Se procede como en el Ejemplo 1 y se obtienen 3,20 g de un sólido blanco (rendimiento del 39%) cuyas características son :

35 *H.P.L.C.*

Mw = 2462

Pd = 1,20

% > 7500 = 4,7

% < 1500 = 1,5

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de fracciones de oligosacáridos derivados de heparina caracterizado porque se realiza la siguiente secuencia de pasos:
 - 5 a) en una sal de heparina se substituyen parcialmente sus grupos carboxilato $R - COO^-$ por grupos anhídrido mixto del tipo $R-CO-O-CO-R'$, donde R' es un alquilo C_1-C_4 o R' es un grupo OR'' con $R'' =$ alquilo C_1-C_4 , obteniéndose así un derivado intermedio de heparina;
 - 10 b) el derivado intermedio de heparina obtenido en el paso anterior, aislado o no, se hace reaccionar a temperatura ambiente con una base orgánica en un disolvente orgánico de tipo aprotíco, dando lugar a un crudo de fracciones despolimerizadas;
 - 15 c) el crudo obtenido en el paso anterior se precipita mediante la adición de una combinación de solución salina con disolventes orgánicos miscibles con agua, y, opcionalmente, el producto en forma de sal, se transforma en su forma ácida.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el derivado intermedio de heparina del apartado (a) se obtiene mediante reacción con un cloruro de ácido $R'-CO -Cl$ o con un cloroformiato de alquilo $R''O-CO-Cl$, donde R' y R'' son alquilos C_1-C_4 .
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, donde el derivado intermedio de heparina no se aísla, sometiéndose "in situ" a la reacción del paso (b) de la reivindicación 1.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sal de heparina de partida es de tipo mixto, de amonio cuaternario (supuestamente unido a grupos sulfato) y de metal alcalino (supuestamente unido a los grupos carboxilato).
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el amonio cuaternario es benzalconio o tetrabutilamonio.
- 35 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la base orgánica usada para la reacción del paso (b) de la reivindicación 1 es hidróxido de N-bencil-trimetilamonio o hidróxido de tetrabutilamonio.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el disolvente utilizado en los pasos (a) y (b) de la reivindicación 1 es N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida o dimetilsulfóxido.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sal obtenida al final del paso (c) de la reivindicación 1 es una sal sódica.
- 45 9. Composiciones terapéuticas útiles para el tratamiento y prevención de alteraciones tromboembólicas, caracterizadas porque comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto obtenido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como principio activo, y una cantidad apropiada de excipiente farmacéuticamente aceptable.

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 077 533

⑯ N.º solicitud: 9400395

⑰ Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.94

⑲ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑳ Int. Cl.º: C08B37/10, A61K31/725

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-9211294-A (FIDIA S.P.A.) 09.07.92 *Todo el documento*	1-9
A	EP-40144-A (PHARMINDUSTRIE) 18.11.81 *Todo el documento*	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 16.10.95	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------